

放射線照射後のラットにおける 酸化ストレス値の経時変化

金子 崇¹, 後藤 準¹, 野宮 琢磨², 根本 建二²

山形大学紀要（自然科学）第17巻第2号別刷

平成23年（2011）2月

放射線照射後のラットにおける酸化ストレス値の経時変化

金子 崇¹, 後藤 準¹, 野宮 琢磨², 根本 建二²

(Received March 31, 2010)

Abstract

Indirect effect of ionizing-radiation causes free radicals and reactive oxygen species (ROS). These ROS interact with DNA or other organella, and cause oxidative damage to nucleic acids, membrane lipoprotein, mitochondria and others. The purpose of this study is to evaluate oxidative damage by irradiation using d-ROMs test. Electron beam was irradiated to the thigh of Wistar strain female rats, and reactive oxygen metabolites in the blood from these rats were measured and analysed. From the results, 2Gy group shows significantly higher oxidative stress level than those of 0Gy group especially in day 3 after irradiation. This oxidative stress definitely seemed to be caused by exposure to ionizing-radiation. In contrast, the group of 30Gy-irradiation showed no significant increase of oxidative stress level. It was thought that oxidative stress caused by radiation was neutralized by expression of stress-induced antioxidant enzymes. These data resulted that d-ROMs test is useful for measuring oxidative stress levels of irradiated mammalian animals.

【背景】 放射線が細胞を傷害するメカニズムは、放射線によってDNAが直接的に切断される直接作用と、放射線によって生じるフリーラジカルやその代謝物によって間接的にDNAが切断される間接作用の2通りに分けられる。このうち約7割は間接作用によってもたらされていると言われている。このことから、放射線が照射された生体におけるフリーラジカル量を計測することは放射線の影響を調べる上で大きな意義があると考え、異なる線量の放射線を照射したラットの酸化ストレス値の経時変化を調べた。

【方法】 実験動物としてWistar系統、6～7週齢、メスのラットを用いた。これを0Gy照射群(コントロール群)、2Gy照射群、30Gy照射群の3群に分け、放射線を照射した。放射線照射前、照射1時間後、3時間後、6時間後、12

¹ 山形大学医学部医学科 (Yamagata University Faculty of Medicine)

² 山形大学医学部放射線腫瘍学 (Department of Radiation Oncology, Yamagata University Hospital)

時間後、24時間後、3日後、7日後、16日後、24日後にd-ROMsテストを行い、酸化ストレス値を測定した。

【結果、結論】 3日目に2Gy照射群のみに放射線の急性期反応と考えられる一過性のピークが見られた。一方で30Gy照射群ではこの反応がみられなかったことから、スカベンジャーシステムの発現に線量の閾値が存在することが推測できた。このように放射線照射による発生フリーラジカル量・酸化ストレス値の変動もd-ROMテストにより数値化できる可能性が示された。

1 序

現代医療において放射線は放射線治療などの癌治療において日常的に使われている。放射線が細胞に与える影響のとしてその大部分を占めるメカニズムは、放射線の作用が細胞核内のDNAを傷害することによって正常な分裂を妨げ、細胞壊死やアポトーシスを起こすことが知られている[1]。DNAに致死障害を受けた細胞は様々な形態の死を呈することが知られており、照射後も細胞分裂を繰り返し死に至る分裂死 (mitotic death) [2, 3]、照射後細胞分裂を待たずに細胞が死に至る細胞間期死 (interphase death) [4, 5]、細胞が自身のDNAを200塩基程度に分断し自ら死に至るアポトーシス (apoptotic death) [6, 7]、アポトーシスとは対照的に受動的な細胞傷害により細胞の代謝活性を維持することができずに死に至る細胞壊死 (necrotic death) などが挙げられる。電離放射線 (ionizing radiation) がDNAを傷害する機序としては、放射線の電離作用によってDNAが直接的に切断される直接作用 (direct effect) と、放射線が水分子を電離することにより生じるフリーラジカルやその代謝物によって間接的に近傍のDNAが切断される間接作用 (indirect effect) の2通りに分けられる[1]。

放射線の間接作用として生じるフリーラジカルは、 H^+ 、 $OH\cdot$ (ヒドロキシルラジカル)、 e_{aq}^- (水和電子)、 H_2O_2 、 $H\cdot$ (水素ラジカル) などがある[8]。このうち e_{aq}^- (水和電子) は速やかに O_2 (酸素分子) と反応して $O_2^{\cdot-}$ (スーパーオキシド) を生じ、 $H\cdot$ (水素ラジカル) と O_2 (酸素分子) も反応して $HO_2\cdot$ (ヒドロペルオキシラジカル) を経て H^+ と $O_2^{\cdot-}$ (スーパーオキシド) を生じる。これらの中では $OH\cdot$ (ヒドロキシルラジカル) や $HO_2\cdot$ (ヒドロペルオキシラジカル) などがDNAと反応しやすいと報告されている[8]。放射線を含む種々のストレスにより誘導されたこれらのフリーラジカルはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などの抗酸化酵素により分解される[9]。先に述べた放射線によるもの以外にも、エネルギー産生系からの電子の逸脱、好中球やマクロファージによる生成といった生体内の不可欠な生化学的反応からフリーラジカルは発生する。このほか喫煙、高血圧、高脂血症、慢性閉塞性肺疾患などの疾患においてもフリーラジカルによる酸化ストレス値が高値を示すことが

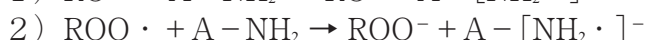
報告されている[10, 11, 12, 13]。

電離放射線の間接作用によってフリーラジカルが生じ細胞を傷害することは知られているが、生体における酸化代謝物を計測することにより経時的変化を調べた研究は今のところ報告されていない。今回我々は照射後の哺乳動物における酸化ストレスの経時変化について解析を行った。

2 対象と方法

フリーラジカル計測法：フリーラジカルや活性酸素は生体内の他の物質との反応性が高く、その寿命は短い。そのため、フリーラジカルとの反応で生じる酸化反応物ROM (Reactive Oxygen Metabolites) を計測することでフリーラジカル・活性酸素種を間接的に計測するd-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites) テストを用いた[14, 15]。

フリーラジカルによる酸化反応物の一つであるヒドロキシペルオキシド(ROOH)は血中など鉄が存在する環境においてアルコキシラジカル(RO \cdot)やペルオキシラジカル(ROO \cdot)を生じる。これらの反応はフェントン反応(Fenton Reaction)の一種とされる[16]。この2種類の代謝物は特定の試薬(N,N-diethyl-para-phenyldiamine: A-NH $_2$)と下記の様な反応を呈する。



上の式のように、フリーラジカル・活性酸素と反応して産生されるアルコキシラジカルもペルオキシラジカルも試薬と反応してA-[NH $_2 \cdot$] $^-$ を生じる。この反応物であるA-[NH $_2 \cdot$] $^-$ はピンク色を呈する物質であり、505nmあるいは546nmの波長を吸収する。よって、採取したラットの血液を特定の試薬と混合した上で一定の波長の光の吸光度を計測することによりその吸収曲線より間接的に発生したフリーラジカル・活性酸素種を定量することが可能になる。計測された酸化代謝物(ROMs)の量を酸化ストレス値とし、これらの数値はCarratelli単位(CARR U)で表記され、数値が高いほど発生ラジカル・酸化ストレスが多いという指標になる。

実験動物：今回の実験では実験動物としてWistar系統、6～7週齢、メスのラットを用いて実験を行った。なお、この実験は山形大学動物実験規程を厳守した上で行った。

放射線照射および採血方法：処置を行う際はラットをジエチルエーテルにて吸入麻酔した後、9%抱水クロラル0.5mlを腹腔内投与し、麻酔下に処置を行った。

麻酔下のラットをアクリル板に固定し、右大腿部の皮膚にのみ放射線を照射した。放射線は4MeV(メガ電子ボルト)の電子線を用い、足関節は2mm鉛板にて遮蔽した。ラットは計測する群を3つの群に分け、0Gy照射群(コントロール群)、2Gy照射群、30Gy照射群とし、それぞれ1群当たり5匹のラットを用いた。

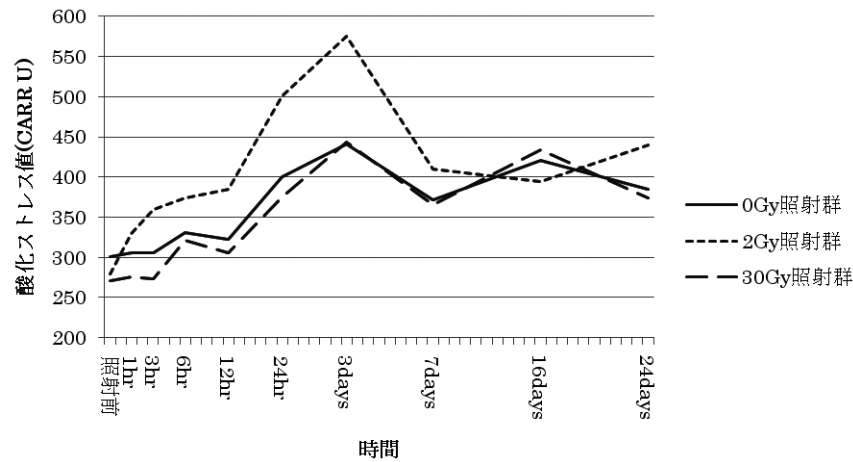


図1 コントロール群、2Gy照射群、30Gy照射群の酸化ストレス値の変化

経時的变化を観察するために放射線照射前、照射1時間後、3時間後、6時間後、12時間後、24時間後、3日後、7日後、16日後、24日後に麻酔下のラットの尾静脈から50 μ l (マイクロリットル) の血液を採取し、d-ROMsテストを行った。

統計学的解析: 経時的变化の統計学的解析にはRepeated-measure ANOVA (analysis of variance) を用い、群間比較にはone-way ANOVA, Student's t-testを用いて有意差検定を行った。[17]

3 結 果

各群のラットに対する放射線照射後の酸化ストレス値と時間の変化を図1に示す。0Gy、2Gy、30Gyの各群の経時変化では、2Gy群において酸化ストレス値が高い傾向が見られ、統計学的に有意であった ($p=0.018$, repeated-measure ANOVA)。

図2に各群の照射後3日目の酸化ストレス値の平均値を示す。0Gy群、2Gy群、30Gy群の平均 (+標準偏差) は各々441.3 (+65.7)、601.8 (+106.0)、443.0 (+79.4) であった。群間比較を行った結果、0Gy群と2Gy群、2Gy群と30Gy群の間に有意差が見られた (0Gy vs. 2Gy: $p=0.034$, 2Gy vs. 30Gy: $p=0.028$)。0Gy群と30Gy群の間に有意差は見られなかった ($p=N.S.$)。

図3に各群の照射後7日目の酸化ストレス値の平均値を示す。0Gy群、2Gy群、30Gy群の平均 (+標準偏差) は各々371.5 (+57.2)、416.0 (+19.2)、365.6 (+73.1) であった。群間比較を行った結果、0Gy群、2Gy群、30Gy群、いずれの群間にも有意差は見られなかった ($p=N.S.$)。

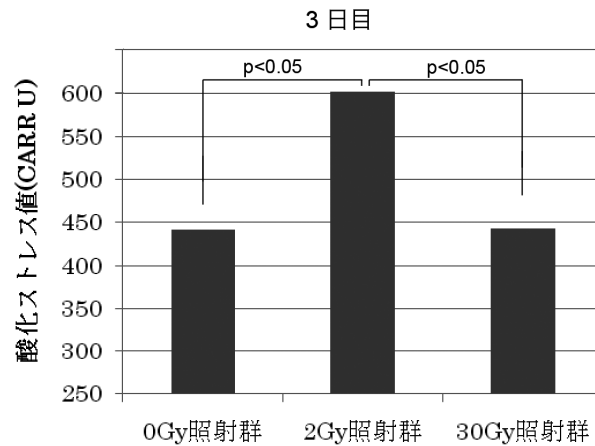


図2 コントロール群、2Gy照射群、30Gy照射群の3日目の酸化ストレス値

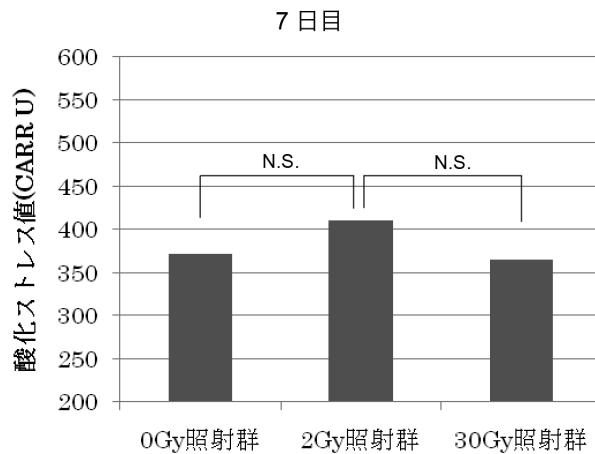


図3 コントロール群、2Gy照射群、30Gy照射群の7日目の酸化ストレス値

4 考 察

(1) 照射後24時間までの反応：

酸化ストレス値の経時的变化を観察した今回の実験の結果として、放射線照射から24時間以内では0Gy群、30Gy群の上昇傾向は僅かであったが、2Gy群は照射後3時間頃より上昇傾向が見られ、前二者と差が出始めていた。

その原因として、放射線の直接作用はゲノムDNAの一本鎖切断や二本鎖切断、あるいはミトコンドリアDNAの切断をもたらし、間接作用により発生したフリーラジカルや活性酸素はDNAの糖鎖や塩基、蛋白質、細胞膜を構成する脂質成分等の酸化があげられる。しかし、一般に種々の原因で生じるスーパーオキシドやヒドロキシラジカルなどの活性酸素は反応性が高いためそ

の寿命はと非常に短く、ミリ秒～マイクロ秒で比較的安定な形のラジカル種（アルコキシラジカル、ペルオキシラジカル）に変化する。これらの物質が蓄積（酸化ストレス値の増加）する機序としては、初回の照射によって生成した活性酸素による酸化反応のみでは考えにくい。

別な機序としては照射による細胞内代謝活性の変化が考えられる。放射線を被曝した細胞は種々の遺伝子や蛋白質が活性化する。p53やMDM2は照射後1～2時間で細胞核内に移行することが観察されている[18]。また、照射後2～6時間でNF- κ Bなど転写因子の合成や下流の蛋白質の合成が開始され、これらは0.5Gy程度の線量でも誘導されることが知られている[19]。放射線照射を受けた細胞内の代謝経路は変化し、放射線感受性の高いリンパ球細胞では照射後24時間程度でアポトーシスを来することが知られている[20]。細胞内エネルギー代謝が活性化するとATP産生でもフリーラジカルが増加することが知られているが、これも照射により活性酸素が増加する一因と考えられる[21]。

もう一つは、細胞内あるいは細胞膜脂質の酸化が考えられる。脂肪酸は光・熱・放射線などの外的要因によって脂肪酸ラジカル（R \cdot ）となる。それが酸化されることでペルオキシラジカル（ROO \cdot ）が生成される。ここで生じるペルオキシラジカルが周囲の脂肪酸と反応することで新たな脂肪酸ラジカル（R \cdot ）が生成される。この連鎖的脂質過酸化反応も経時的にフリーラジカルが増加していく原因の一つと考えられる[22]。

(2) 照射後3日目の反応：

酸化ストレス値は照射後3日目の2Gy照射群でピークが見られ、他の群より有意に高かった。前章で酸化ストレス値増加の機序を考察したが、線量に応じて酸化ストレスが増加すると仮定すると2Gy群よりも30Gy群で酸化ストレス値が低い点に於いて矛盾が生じる。この機序の一つとして、発生したフリーラジカルや活性酸素を減少させる機序が働いたことが考えられる。

放射線や炎症物質など細胞がストレスに曝されると防護作用が働き転写因子や蛋白質が発現する。転写因子ではNF- κ BやAP-1などが放射線照射後や活性酸素への被曝後に増加し、発現遺伝子ではスーパーオキシドを分解する役割を果たすSOD（スーパーオキシドジスムターゼ）、GSH（グルタチオン）、過酸化水素を分解するカタラーゼ、これらが体内で合成される代表的な抗酸化物質・スカベンジャーシステムとして知られている[23]。

30Gy群において酸化ストレス値が2Gy群より低値を示す理由の一つとして、多量の放射線により放射線誘導遺伝子あるいはストレス誘導遺伝子が多量に発現し、酸化物質を処理する能力が亢進していたと考えられる。一部の蛋白質において放射線被曝線量が多いほど発現量が多かったり、一部の細胞では被曝線量が多いほどアポトーシスまでの時間が早められたりする現象が報告されている[19, 20]。これらの現象は線量に応じて発現蛋白質の種類や量に変化することを示唆し、発現に線量閾値があることも示唆している。このことから3日目の酸化ストレス値の逆転が起こる理由としては、より多い線量を受け

た群の抗酸化酵素誘導が亢進して抗酸化力が亢進したために対照群と殆ど変わらなかった可能性が考えられる。逆に、2Gy程度の線量では細胞の傷害や酸化ストレスは誘導されたが、抗酸化酵素群誘導の閾値までには至らず酸化ストレスが蓄積していった、あるいは抗酸化酵素群が遅れて発現したために酸化ストレスが蓄積したことが仮説として考えられる。

(3) 照射後7日目以降の反応：

酸化ストレス値はいずれの群に於いても緩徐に上昇する傾向が見られた。この現象に関しては放射線を照射していないコントロール群でも上昇している。これは今回用いたd-ROMsテストは人間での臨床研究にも用いられ、喫煙、肥満といった生活習慣、糖尿病における高血糖状態などの一部の疾患、様々なタイプのストレスによって基準値よりも高い値を示すことが示されている。これと同様にラットの生活環境が変化したことや、採血時の補綴、麻酔、創傷などにより生じた身体的、精神的ストレスが原因で徐々に上昇したのではないかと考えられる。

今回の実験では放射線被曝に対する急性期の反応として活性酸素種(Reactive Oxygen Species)が増加することが示された。低線量照射群では放射線が誘因と考えられる酸化ストレス値のピークが見られた。これまでd-ROMsテストはヒトの喫煙や糖尿病などで上昇することが報告されていたがヒトの放射線被曝後の変化の報告はまだ無い。ラットという哺乳動物における照射反応はヒトにおける被曝後の酸化ストレス反応を計測することに応用できると考えられる。また、酸化ストレス値により組織の損傷を指標化できれば線量の調節やラジカルの中和剤投与など治療適応の選択指標へも応用できる可能性がある。しかし、30Gy照射群の奇異な反応に関しては更なる検証が必要と考えられた。また、高線量被曝後の晩期放射線障害が形成された段階において酸化ストレス値が障害とどのように相関するかも今後の検討の課題と考えられる。

謝辞

本研究は科学研究費補助金[若手(B)20790876]の助成を受けたものである。

参考文献

- [1] Perez CA. The Discipline of Radiation Oncology. In: Perez CA, Brady LW, Halperin EC and Schmidt-Ullrich R. Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins; Fourth Edition (2003), p9-10.
- [2] Thompson LH, Suit HD. Proliferation kinetics of x-irradiated mouse L cells studied WITH TIME-lapse photography. II. Int J Radiat Biol Relat Stud

- Phys Chem Med. 1969;15(4):347-62.
- [3] Tolmach LJ. Growth patterns in x-irradiated HeLa cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1961, 95:743-57.
- [4] Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995 33(4):781-96.
- [5] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 26(4):239-57.
- [6] Milas L, Stephens LC, Meyn RE. Relation of apoptosis to cancer therapy. In *Vivo.* 1994 8(5):665-73.
- [7] Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:217-45.
- [8] Hutchinson F, Chemical Changes Induced in DNA by Ionizing Radiation, In: Cohn, Waldo E. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology) <32>.* Florida, Academic Press, Inc., 1985, p117-118.
- [9] de Abreu FC, Ferraz PA, and Goulart MO. Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. *J. Braz. Chem. Soc.,* 13(1), 19-35, 2002.
- [10] Hayashi I, Morishita Y, Imai K, Nakamura M, Nakachi K, Hayashi T. High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutat Res.* 2007, 10;631(1):55-61. Epub 2007 Apr 20.
- [11] Incandela L, Belcaro G, Cesarone MR, De Sanctis MT, Griffin M, Cacchio M, Nicolaides AN, Bucci M, Barsotti A, Martines G, Cornelli U, Di Renzo A. Oxygen-free radical decrease in hypertensive patients treated with lercanidipine. *Int Angiol.* 2001 Jun;20(2):136-40.
- [12] Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem.* 2008 Oct;41(14-15):1162-7. Epub 2008 Jul 26.
- [13] Markoulis N, Gourgoulisanis KI, Moulas A, Gerogianni E, Molyvdas AP. Reactive oxygen metabolites as an index of chronic obstructive pulmonary disease severity. *Panminerva Med.* 2006, 48(4):209-13.
- [14] Pasquini A, Luchetti E, Marchetti V, Cardini G, Iorio EL. Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. *Vet Res Commun.* 2008, 32(2):137-43. Epub 2007 Sep 11.
- [15] Alberti A, Bolognini L, Macciantelli D, Carratelli M. The radical cation of N,N-diethyl-para-phenylenediamine: a possible indicator of oxidative stress

- in biological samples. *Res Chem Intermed*. 2000. 26 (3): 253-67.
- [16] Stadtman ER, Berlett BS. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem*. 1991, 266(26):17201-11.
- [17] Armitage P, Berry G, Matthews JNS. Statistical methods in medical research. 5th ed. 2002. Blackwell Science. Ltd. 2002: 312-716.
- [18] Martinez JD, Pennington ME, Craven MT, Warters RL, Cress AE. Free radicals generated by ionizing radiation signal nuclear translocation of p53. *Cell Growth Differ*. 1997, 8(9):941-9.
- [19] Lyng H, Landsverk KS, Kristiansen E, DeAngelis PM, Ree AH, Myklebost O, Hovig E, Stokke T. Response of malignant B lymphocytes to ionizing radiation: gene expression and genotype. *Int J Cancer*. 2005 Jul 20;115(6):935-42.
- [20] Ogawa Y, Kobayashi T, Nishioka A, Kariya S, Hamasato S, Seguchi H, Yoshida S. Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cells. *Int J Mol Med*. 2003 Feb;11(2):149-52.
- [21] Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002 Oct;227(9):671-82.
- [22] Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):378-84.
- [23] Babior BM. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res*. 1997 Feb;30(2):141-55.